

ÜBER DIE BESTIMMUNG
DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE
UND DES ANORGANISCHEN PHOSPHORS
IM SERUM MIT DER ULTRAMIKROMETHODE
NACH M.C. SANZ

Hans Jacobi

1964

ÜBER DIE BESTIMMUNG
DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE
UND DES ANORGANISCHEN PHOSPHORS
IM SERUM MIT DER ULTRAMIKROMETHODE
NACH M.C. SANZ

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Jacobi
aus Dortmund

München 1964



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Privat-Dozent Dr. D. VOGT
Correferent:	Professor Dr. G. WEBER
Dekan:	Professor Dr. R. BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 17.3.1964



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG	5
B. ALLGEMEINER TEIL	6
1. Kurze Beschreibung des Ultramikroanalysensystems	6
2. Eigene Erfahrungen mit dem System	6
3. Fehlerrechnung	7
C. SPEZIELLER TEIL	9
I. Bestimmung der alkalischen Phosphatase	9
1. Entwicklung der Methode	9
2. Beschreibung der Methode	11
3. Diskussion der Methode	15
II. Bestimmung des anorganischen Phosphors	23
1. Entwicklung der Methode	23
2. Beschreibung der Methode	24
3. Diskussion der Methode	27
D. ZUSAMMENFASSUNG	36



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. EINLEITUNG

Von M.C. Sanz, Leiter des Kantonspitals Genf, und der Firma Beckman-Instruments, Palo Alto (Kalifornien), wurde ein Ultramikroanalysensystem zur quantitativen Bestimmung verschiedener Serumbestandteile im Mikroliterbereich entwickelt. Die einzelnen Bestimmungsmethoden dieses Systems stellen Modifikationen bewährter Makromethoden für den Mikroliterbereich dar und erlauben es, mit geringen Serumengen sowohl Einzel- als auch Serienbestimmungen durchzuführen (24, 31, 33).

In den Laboratorien der pädiatrischen Kliniken werden chemische Serumuntersuchungsmethoden angestrebt, die mit wenigen Tropfen Blut, welche mittels Schnepferstich aus der Ferse oder Fingerbeere gewonnen werden, genaue und umfangreiche Bestimmungen erlauben. Daher ist der Kinderarzt an der Entwicklung und Anwendung solcher Methoden im Mikroliterbereich interessiert, aber nicht nur im Neugeborenen- und Säuglingsalter, sondern auch bei Erwachsenen sieht man sich häufig der Schwierigkeit ausgesetzt, die zur chemischen Laboratoriumsdiagnostik notwendigen Blutmengen zu gewinnen.

Es mag daher gerechtfertigt sein, im folgenden einen Beitrag zu liefern, wie das Problem der Mikroanalyse in der täglichen Routinearbeit eines Laboratoriums gelöst werden kann. Die hier beschriebenen Untersuchungen sind in einer pädiatrischen Klinik durchgeführt worden und vorwiegend praktischen Gesichtspunkten gewidmet.

Es wird eine Methode im Mikroliterbereich zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum mit dem Ultramikroanalysensystem nach M.C. Sanz beschrieben, und es soll die Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphors im Serum nach dem gleichen System auf ihre Verwendbarkeit in der klinischen Laboratoriumsdiagnostik geprüft werden.

1. Kurze Beschreibung des verwendeten Ultramikroanalyssystems

Wie schon oben erwähnt, werden die hier angegebenen Methoden mit dem "Vollständigen System für die quantitative Ultramikroanalyse im klinischen Laboratorium" der Firma Beckman-Instrumente durchgeführt. Es handelt sich um eine in Deutschland eingeführte Methode (25, 32), weshalb im folgenden auf eine ausführliche Beschreibung derselben verzichtet wird.

Die Bestimmungen mit dem Ultramikroanalyssystem werden mit zusammengehörenden Geräten und Gefäßen durchgeführt: Probe- und Reagenspipetten, ein Spektrokolorimeter, eine Zentrifuge und ein Mischmotor, eine Bürette, Reagens- und Zentrifugenröhrchen sowie Titrationsbecher. Da die Bürette und die Titrationsbecher für Titrationsbestimmungen verwandt werden, sollen sie im Rahmen dieser Arbeit, welche sich mit Farbtesten beschäftigt, nicht weiter erwähnt werden.

Die Mikropipetten aus Polyäthylen und ihre Kombination mit Überlauf- und Reagensflaschen aus dem gleichen Material sind einer einzigen Bestimmungs- methode zugeordnet und werden jeweils nur zum Pipettieren von einer Substanz gebraucht.

2. Eigene Erfahrungen mit dem System

Die Mikropipetten haben sich in der Praxis ausgezeichnet bewährt. Die Technik des Pipettierens mit der Hand erfordert allerdings Übung, um die entsprechende Genauigkeit zu erreichen. Besonders sorgfältig muß die Reinigung der Pipetten ausgeführt werden. Eintrocknen von Serumrückständen ist durch Nachspülen mit aqua bidestillata zu vermeiden. Als empfehlenswerte Reinigung hat sich das Einlegen der Pipetten in fermentativ wirkende, milde Reinigungsmittel, zum Beispiel bei 37° C, über mehrere Stunden hin erwiesen, wonach mehrmals mit aqua bidestillata nachgespült werden muß. Dabei schließt man die Pipetten am besten kurzfristig an eine kleine Wasserstrahlpumpe an.

Das speziell für den Mikroliterbereich entwickelte Spektrokolorimeter hat sich als zuverlässig und vorteilhaft erwiesen. Es können sämtliche angegebenen Vorzüge bestätigt werden. Auf folgende Erfahrungen sei jedoch hingewiesen:

1. Die Abdichtungen innerhalb des geschlossenen Pumpsystems sind nicht immer zuverlässig. Der Dichtungsring am unteren Stutzen des Küvettenhalters muß von Zeit zu Zeit erneuert werden, - vor allem bei Arbeiten mit konzentrierten Säuren.
2. Niedergeschlagene Kondensflüssigkeit im Zuleitungsschlauch zur Vakuumpumpe kann die Pumpwirkung beeinträchtigen.

3. Die Gewindeführung zur Abdichtung der Waschflasche ist sehr grob, so daß das Gewinde der Glasflasche beim Ein- und Ausdrehen häufig zerbricht. Es ist eine Anfertigung der Waschflasche aus plastischem Material zu empfehlen.
4. Bei abwechselnden Messungen von Blindwert-, Standard- und Probelösungen ist es günstiger, Mehrfachbestimmungen durchzuführen, um mit der ersten der zu bestimmenden Farblösungen das Küvettenröhrchen durchzuspülen. Dadurch wird der sich in der Küvette befindende Inhalt der folgenden Farbkonzentration angeglichen. Bei großen Konzentrationsunterschieden ergibt sich dadurch eine erhebliche Erhöhung der Meßgenauigkeit.

Die Reagens- und Zentrifugenröhrchen werden nach dem Gebrauch verworfen, so daß eine Beeinträchtigung der Bestimmungsreaktion in denselben durch eine Verunreinigung nicht gegeben ist. Die Verschließbarkeit der Röhrchen mit einem Stöpsel macht eine gute Durchmischung der geringen Mengen von Reaktionslösungen mit Hilfe des Mischmotors möglich. Diese Teströhrchen lassen sich zur Rationalisierung des Arbeitsganges während einer Analyse sowie zur Vermeidung von Fehlerquellen in optimal günstiger Weise verwenden.

Dergleichen macht der Gebrauch der Mikrozentrifuge und des Mikromixers ein sehr schnelles und sauberes Arbeiten möglich.

Schon die oberflächliche Beurteilung eines in sich abgeschlossenen Analysensystems im Mikroliterbereich läßt erhebliche Vorteile erkennen: die Apparate sind klein und benötigen wenig Platz; sie sind übersichtlich und mit wenigen Handgriffen zu bedienen; die Gefahr, durch Benutzung unsauberer Gefäße sowie durch umständliche Manipulationen an verschiedenen Arbeitsplätzen die Analyse mit Fehlerquellen zu belasten, ist auf eine minimale Größe herabgesetzt. Dabei wird jedoch offensichtlich, daß die Abhängigkeit von Ergänzungs- und Ersatzteilen sowie das Ausfallen eines Apparates in diesem System zu der Vorsicht zwingt, das dauernde Funktionieren desselben zu überprüfen und aufrecht zu erhalten.

3. Fehlerrechnung

Um ein Bild über die Genauigkeit der beiden beschriebenen Methoden zu gewinnen, wurden entsprechende Serienbestimmungen durchgeführt und darüber eine statistische Fehlerrechnung angefertigt. Dieser Rechnung liegen folgende theoretische Voraussetzungen zugrunde (8):

Den mittleren quadratischen Fehler (Varianz) berechnet man statistisch nach der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_m)^2 f_i}{\sum f_i}}$$

Zur Erklärung:

Σ ist das Summenzeichen für eine ganze addierte Serie, und zwar

$$\Sigma[(x_i - x_m)^2 f_i].$$

x_i ist ein einziges Merkmal,

f_i ist die Häufigkeit eines einzigen Merkmals.

Σf_i ist die Summe aller Häufigkeiten der einzelnen Merkmalsausprägungen.

x_m ist der Mittelwert aller einzelnen Merkmale. Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$x_m = \frac{\Sigma x_i \cdot f_i}{\Sigma f_i}$$

σ ist als Maß für die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert definiert.

CV ist der Variationskoeffizient, der σ in Prozenten von x_m ausdrückt. Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$CV = \frac{\sigma \cdot 100}{x_m}$$

C. SPEZIELLER TEIL

I. BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IM SERUM

1. Entwicklung der Methode

Im Laufe der vergangenen dreißig Jahre stand die alkalische Phosphatase häufig im Mittelpunkt zahlreicher Veröffentlichungen. Beim eingehenden Studium dieser Literatur wird deutlich, daß die Aktivität der alkalischen Phosphatase bei differentialdiagnostischen Überlegungen in der Klinik von Bedeutung ist, jedoch die Aktivitätsbestimmungen im Laboratorium noch sehr unbefriedigend sind. Auf Grund der deshalb entwickelten vielfältigen Bestimmungsmethoden und Modifikationen, sowie der jeweils dazugehörenden verschiedenen Aktivitäts-Einheitsdefinitionen, sind die an sich schon problematischen Fermentbestimmungen für die praktische Anwendung zusätzlich erschwert worden.

Im Neugeborenen-, Säuglings- und Kindesalter kommt der Erhöhung der alkalischen Serumphosphataseaktivität bei Knochenerkrankungen mit gesteigerter Osteoblastentätigkeit - im besonderen bei der Rachitis - sowie bei Leberparenchymschäden besondere Bedeutung zu. Die Bestimmungen in diesen Altersstufen werden jedoch nur in kleinem Rahmen durchgeführt, da der intravenösen Blutentnahme aus technischen Gründen und wegen der überhaupt vorhandenen geringen Blutmengen Grenzen gesetzt sind. Es liegt daher im Bestreben des Pädiaters, Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der alkalischen Serumphosphatase zu entwickeln, die Bestimmungen mit wenigen Blutstropfen, welche man mittels Schnepferstich erhält, erlauben, zugleich aber Anforderungen auf Einfachheit, Zuverlässigkeit und hinreichende Genauigkeit des Analysenganges erfüllen.

Die Entwicklung von Mikromethoden zur Phosphatasebestimmung, sowie die Standardisierung der verschiedenen Einheitsdefinitionen über die Enzymaktivität wurde dadurch erschwert, daß zwar genügend Phosphatester als Substrate gefunden wurden, dieselben aber ungeeignet waren, um mikromethodische Aktivitätsbestimmungen der Phosphatase zu erlauben. Es soll deswegen ein kurzer Überblick über die bisher beschriebenen Substrate und ihre Anwendbarkeit in Mikromethoden gegeben werden.

Seit der Entdeckung der alkalischen Phosphatase im Jahre 1927 sind sehr zahlreiche Bestimmungsmethoden entwickelt worden, deren grundlegendes Prinzip darin besteht, unter bestimmten Bedingungen der Temperatur und des pH-Wertes die Stärke der Hydrolyse an verschiedenen Phosphatestern in einer bestimmten Zeit zu messen. Bei den Phosphatestern lassen sich zwei Substratgruppen unterscheiden, von denen die Spaltprodukte der einen Substratgruppe Indikatoreigenschaften haben, und die der anderen Gruppe diese nicht haben.

Die bisher gebräuchlichen Bestimmungsmethoden der Gruppe ohne Indikator-eigenschaften sind die - schon als klassisch bezeichnete - Methode nach Bodansky (5) mit Na- β -Glycerophosphat als Substrat und diejenige nach King-Amstrong (17) mit Di-Na-phenylphosphat als Substrat. Weitere Methoden wurden mit Glucерophosphat, Hexosephosphat und mit Dikaliumphenylphosphat angegeben. Diese Methoden unterscheiden sich lediglich dadurch, daß die Phosphatester mit verschiedener Geschwindigkeit gespalten werden und in einem jeweils anderen pH-Milieu das Wirkungsoptimum ihrer Spaltung haben (18).

Die Methode nach King-Amstrong wurde 1959 in Deutschland von Kirberger und Martini (19) sowie anderen Autoren (10, 21) modifiziert und erfreut sich weiter Verbreitung in der klinischen Anwendung. Deshalb soll sie hier kurz diskutiert werden. Es wird von verschiedenen Autoren (3, 14) als nachteilig bezeichnet, daß die Methode nach King-Amstrong sehr umständlich und zeitraubend ist, da eine Eiweißausfällung, umfangreiche Vorarbeiten zur Aufstellung einer Eichkurve, zwei unabhängige Zeitreaktionen und mehrmaliges Übertragen von Lösungen erforderlich sind. Außerdem ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Substratspaltung sehr gering.

Schon allein diese - von praktischen Gesichtspunkten beurteilt - nachteiligen Faktoren lassen die Methode nach King-Amstrong sowie alle ähnlichen Modifikationen derselben als ungeeignet zur Umarbeitung auf eine Mikromethode erscheinen. Sie haben sich bei der Notwendigkeit, bei einer großen Zahl von Patienten schnell Bestimmungen durchzuführen, als unzureichend erwiesen und zur Verwendung anderer Substrate sowie zur Entwicklung einfacherer Methoden geführt.

Huggin und Talalay gaben 1945 (15) eine Methode an, deren Prinzip darin bestand, daß bei der Verwendung von Di-Na-Phenolphthaleinphosphat als Substrat der Phosphorsäurerest abgespalten wird und Phenolphthalein in Freiheit gesetzt wird, welches nach Zugabe von Alkali eine Rotfärbung der Lösung bedingt. Jedoch nach Angaben von Huggin (15) und anderen Autoren (3, 22, 12) ist die entstehende Farbe des Phenolphthaleins nicht proportional der Enzymaktivität. Als Ursache dafür wird vermutet, daß die beiden im Phenolphthaleindiphosphat veresterten Phosphatgruppen ungleich abgespalten werden, und statt Phenolphthalein teilweise nur das farblose Phenolphthaleinmonophosphat entsteht. Deswegen ist die Aufstellung zweier Eichkurven nötig, um durch Aufzeichnung des Logarithmus der Phenolphthaleinkonzentration gegen den Logarithmus der Phosphataseaktivität eine lineare Abhängigkeit zu erhalten.

Die Korrektur dieser nicht linearen Proportionalität wird durch das Anfertigen von Verdünnungslösungen sehr umständlich und ist in ihrer klinischen Anwendung problematisch. Der Nachteil dieser im Prinzip sehr brauchbaren Methode und einer mikromethodischen Modifikation von Hövels und Laun (12) liegt zweifellos im

ungeeigneten Substrat, so daß Bessey, Lowry und Brock 1946 (3) ein neues Substrat angegeben haben: p-Nitrophenylphosphat. Die Vorteile dieses Substrats haben zur Anwendung desselben bei verschiedenen Mikromethoden geführt, welche sich im Prinzip an die Methode von Bessey anlehnen:

So wurde diese Methode von der Firma Boehringer in Mannheim (4) als Mikromethode modifiziert, wobei das benötigte Substrat p-Nitrophenylphosphat-Na sowie ein Glycin-Puffer von dieser in den entsprechenden Konzentrationen gebrauchsfertig geliefert werden. Diese vorbereiteten Arbeitslösungen sind von großem praktischen Vorteil, und die hier neu beschriebene Methode macht von diesen Reagenzien Gebrauch.

Ebenfalls wurde von M.C. Sanz (24) während der Entwicklung der hier beschriebenen Methode die Methode von Bessey modifiziert, um diese mit dem Ultramikroanalysensystem von Beckman-Instruments durchzuführen. Einige methodisch sehr vorteilhafte Angaben von M.C. Sanz sind in die hier beschriebene Methode übernommen worden.

So greift auch die hier angegebene Methode als Modifikation der Methode nach Bessey auf eine in der Praxis sehr bewährte Phosphatasebestimmungsmethode zurück. Es wurde so vermieden, zu den zahlreichen alten Bestimmungsmethoden eine neue unwesentliche Variation hinzuzufügen, sondern es wurde vielmehr versucht, durch die Kombination eines technisch vorteilhaften Bestimmungsprinzips mit einer bewährten Analysenmethode die heute zur Verfügung stehenden optimalen Versuchsbedingungen für diese Fermentbestimmung auszunützen. Sie soll im folgenden ausführlich beschrieben und anschließend diskutiert werden.

2. Beschreibung der Methode

Prinzip:

Die alkalische Phosphatase bewirkt eine hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern in alkalischer Lösung. Als Substrat wird das farblose Para-Nitrophenylphosphat verwandt, welches nach Abspaltung der Phosphatgruppe in dreißig Minuten bei 37° C und pH 10,5 das gelbe p-Nitrophenol freisetzt, das nach Zugabe von Alkali bei einer Wellenlänge von 400 m μ kolorimetrisch bestimmt wird. Die Menge des abgespaltenen p-Nitrophenols ist ein Maß und gleichzeitiger Indikator für die Hydrolyse am Substrat, und diese ist wiederum ein Maß für die Aktivität der alkalischen Phosphatase.

Die Inkubation des Substratpuffers erfolgt mit und ohne Serum, so daß nach Bildung der Differenz der beiden Extinktionen der Farbwert des Serums, sowie die Farbbildung durch Spontanhydrolyse des Substratpuffers während der Inkubation von der gesamten Farbintensität abgezogen werden.

Notwendige Reagenzien: (aus "Biochemica Boehringer")

1. Glycin
2. p-Nitrophenylphosphat-Na
3. Natronlauge
4. p-Nitrophenol

Herstellung der Lösungen:

I. Puffer:

0,005 M Glycinpuffer pH = 10,5

$5 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2

Die in Fläschchen 1) befindliche Lösung ist bidest. Wasser ad 200 ml verdünnen.

II. Substrat:

ca. 20 Tabletten mit je 15 mg p-Nitrophenylphosphat-Na

III. Puffer/Substrat:

0,05 M Glycinpuffer pH = 10,5

$5 \cdot 10^{-4}$ M MgCl_2

$5,5 \cdot 10^{-3}$ M p-Nitrophenylphosphat-Na

Für ca. 100 Bestimmungen 1 Tablette "Substrat" aus Fläschchen 2) in 10 ml Puffer I) lösen.

IV. Natronlauge:

0,04 n NaOH

V. p-Nitrophenol:

Man bereite eine wäßrige Lösung von 10 mMol/l p-Nitrophenol (1 Mol = 139,1 g)

Haltbarkeit der Lösungen:

Der Puffer I) ist bei Aufbewahrung in verschlossener Flasche unter Vermeidung von Bakterienwachstum auch bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar. Da dieser Puffer mit der Zeit Kohlendioxyd aus der Luft aufnehmen kann, den pH-Wert nach einiger Zeit überprüfen und gegebenenfalls mit einigen Tropfen konzentrierter Natronlauge nachstellen.

Die Substrat-Tabletten sind trocken aufbewahrt unbegrenzt haltbar.

Die Lösung "Puffer/Substrat" III) stets kühl halten (0 bis 6°C). Sie kann bis zu einer Woche verwendet werden.

Die Natronlauge IV) ist unbegrenzt haltbar, wenn sie stets verschlossen in einer Flasche mit Gummi- oder Kunststoffstopfen aufbewahrt wird.

Die wäßrige Lösung von p-Nitrophenol wird nur einmal zur Herstellung der Eichkurve gebraucht und soll dann frisch zubereitet werden.

Tabelle 1Schema des Arbeitsganges der Phosphatasebest.:

Reagenz	Teströhrchen für Blindwert	Teströhrchen für Probe
Puffer/Substrat	50 μ l	50 μ l
Serum		5 μ l
mischen		
zentrifugieren		
31 min. in Wasserbad bei 37°C inkubieren		
NaOH 0,04 n	250 μ l	250 μ l
Serum	5 μ l	
mischen		
ca. 5 min. stehenlassen		
bei Wellenlänge 400 m μ kolorimetrieren,		
vorher den Nullwert mit NaOH 0,04 n einstellen		

Einheitsdefinition:

1 U.B. (Phosphataseeinheit nach Bessey) ist die in einem Liter Serum enthaltene Enzymmenge, die in einer Stunde bei 37°C 1 mMol = 140 mg p-Nitrophenol freisetzt.

Eichkurve:

1. Man bereite eine wäßrige Lösung von 10 mMol/l oder 0,010 μ Mol/ μ l. (1 Mol = 139,1) p-Nitrophenol.

2. Man bereite jeweils eine Lösung von

- a) 10 μ l Lsg. 1.)
+190 μ l aqua bidest.
- b) 20 μ l Lsg. 1.)
+180 μ l aqua bidest.
- c) 40 μ l Lsg. 1.)
+160 μ l aqua bidest.
- d) 50 μ l Lsg. 1.)
+150 μ l aqua bidest.
- e) 100 μ l Lsg. 1.)
+100 μ l aqua bidest.

3. Mit 5 μ l dieser einzelnen Lösungen bereite man jeweils folgende Lösungen:
50 μ l Puffer I

250 μ l NaOH 0,04 n

5 μ l Lsg. 2.) a) b) usw.

Man lese die Absorption dieser Lösungen bei 400 m μ ab, nachdem der Nullwert mit NaOH 0,04 n eingestellt worden ist.

Die erhaltenen Absorptionen entsprechen jeweils Lsg. 3. a) = 1 U.B.

b) = 2 U.B.

c) = 4 U.B.

d) = 5 U.B.

e) = 10 U.B.

Denn zum Beispiel sind in Lsg. 2 a) in einem Volumen von 250 μ l 0,10 μ Mol gelöst, d.h. in 5 μ l dieser Lösung sind 0,0025 μ Mol enthalten. In der Lösung 3 a) sind somit in einem Volumen von 305 μ l 0,0025 μ Mol gelöst, was nach der angegebenen Einheitsdefinition 1 U.B. entspricht.

Man trage in einem Koordinatensystem auf Millimeterpapier die erhaltenen Extinktionen der Lösungen 3 a) bis 3 e) gegen die entsprechenden oben angegebenen Phosphataseeinheiten ein und berechne den Faktor f_m wie folgt:

$$f_a = \frac{1}{\text{Ext. Lsg. 3a}}$$

$$f_b = \frac{2}{\text{Ext. Lsg. 3b}}$$

$$f_c = \frac{4}{\text{Ext. Lsg. 3c}}$$

$$f_d = \frac{5}{\text{Ext. Lsg. 3d}}$$

$$f_e = \frac{10}{\text{Ext. Lsg. 3e}}$$

$$f_m = \frac{f_a + f_b + f_c + f_d + f_e}{5}$$

Berechnung:

$$\Delta E = (\text{Ext. Probe}) - (\text{Ext. Blindwert})$$

$$\Delta E \cdot f_m = \text{Phosphataseaktivität (U.B.)}$$

3. Diskussion:

Zum Prinzip:

Nach Angaben der Autoren (3) wird p-Nitrophenylphosphat um 15 % schneller als Phenylphosphat gespalten, 2-3 mal schneller als Glycerophosphat und 25-30 mal schneller als Phenolphthaleinphosphat. Durch Abspaltung der Phosphatgruppe verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 310 m μ auf 400 m μ . Die Absorption ist dann doppelt so hoch. Die Blindwertkorrektur infolge der Serumfarbe und Spontanhydrolyse des Substrats beruht auf der Tatsache, daß Serum bei 415 m μ etwa das gleiche Absorptionsmaximum hat wie p-Nitrophenol. Das Ausmaß der Phosphatabspaltung innerhalb von 30 min. wurde als linear proportional der Enzymaktivität gefunden, jedoch ist die Proportionalität nicht mehr linear nach 30 min. Inkubationszeit.

Wegen der oben genannten Vorteile und besonders wegen der hohen Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse und der starken farbgebenden Wirkung des p-Nitrophenols erfüllt dieses Substrat die Anforderungen für eine Mikromethode im Mikroliterbereich.

Die Methode nach Sanz (24) setzt zur Bestimmung der Fermenthydrolyse 4 Teströhrchen in das Inkubationsbad ein, um die Extinktionsgröße der Farbintensität von der spontanen Substrathydrolyse und von der Serumfarbe zu bestimmen. Die 4 Teströhrchen haben folgenden Inhalt:

Blindwert:	1. Röhrchen	H ₂ O _B	Wasserpuffer	50 μ l
			aqua dest.	5 μ l
	2. Röhrchen	H ₂ O _A	Substratpuffer	50 μ l
			aqua dest.	5 μ l
Probewert:	3. Röhrchen	S _B	Wasserpuffer	50 μ l
			Serum	5 μ l
	4. Röhrchen	S _A	Substratpuffer	50 μ l
			Serum	5 μ l

Das Einsetzen von 4 Teströhrchen erscheint nach folgenden Ausführungen überflüssig zu sein: Die Phosphataseaktivität der Methode nach Sanz berechnet sich aus Phosphataseaktivität = (S_A - S_B) - (H₂O_A - H₂O_B)

Das Teströhrchen S_A enthält die Farbintensität der
Spontanhydrolyse des Substrats
Fermenthydrolyse der Phosphatase
Serumfarbe

Das Teströhrchen S_B enthält nur die Farbintensität der
Serumfarbe.

Die Farbintensität der ersten Klammer der oben genannten Formel S_A - S_B be-

steht also aus der Spontanhydrolyse des Substrats und der Fermenthydrolyse der Phosphatase. Die zweite Klammer $H_2O_A - H_2O_B$ stellt nur die Farbintensität der Spontanhydrolyse des Substrats dar. Die Phosphataseaktivität besteht also aus der Differenz der Farbintensitäten wie folgt:

$$\text{Fermenthydrolyse} = (\text{Fermenthydrolyse} + \text{Spontanhydrolyse}) - (\text{Spontanhydrolyse})$$

Das gleiche Ziel wird in der hier beschriebenen Methode mit nur zwei Teströhrchen erreicht, indem nämlich in dem Teströhrchen für den Blindwert die Farbgebung durch die Spontanhydrolyse des Substrates sowie durch die Serumfarbe erfolgt, während im Teströhrchen für die Probe zusätzlich die Fermenthydrolyse der Phosphatase erfolgt. Die Differenz beider Extinktionen ergibt also auch die Farbintensität der Fermenthydrolyse.

Als Voraussetzung zu dem oben gemachten Vergleich sei erwähnt:

1. Wasser, Puffer und Natronlauge zeigen keine Absorption, da der Nullwert mit Wasser bzw. mit Natronlauge eingestellt wird. Bei Nachprüfungen der Extinktionen wurden für das Teströhrchen H_2O_B folgende Werte gemessen:

Ext.: 0	17 mal
Ext.: 0,002	1 mal
Ext.: 0,005	2 mal
2. Die Substratkonzentrationen der Substratpufferlösungen entsprechen sich ungefähr, so daß in etwa im gleichen Substratüberschuss die Inkubation erfolgt. In der hier angegebenen Methode enthält 1 ml Puffer 1,5 mg Substrat, in der Methode nach Sanz sind es 2 mg.
3. Die Reagenzien in Puffer und Substrat sind von der Firma Boehringer bezogen worden. Es besteht die Möglichkeit, daß bei Verwendung anderer Substanzen die Substratpuffergemische instabiler werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das in der oben angegebenen Methode angewandte Prinzip ein einfaches ist, welches mit geringstem Aufwand die entsprechenden Anforderungen erfüllt.

Zu den Reagenzien:

Die Angaben über die notwendigen Reagenzien, die Herstellung der Lösungen sind aus einer Methodenbeschreibung zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum von der Firma Boehringer entnommen (4). Der Puffer ist unter dem Kennwort: TC-P Nr. 15987 und das Substrat ist unter dem Kennwort: TC-P Nr. 15987 von der Firma zu beziehen. Die Beschreibung der Herstellung der Eichlösung aus p-Nitrophenol mußte zugefügt werden, da die Bestimmungs-methode von Boehringer ohne Eichkurve angegeben worden ist. Die Form, in der die Reagenzien fast gebrauchsfertig geliefert werden, stellt die im Augenblick günstigste Möglichkeit dar, die Reagenzien für die Bestimmungen vorzubereiten und hierbei Fehlerquellen zu vermeiden. Es wäre zu wünschen, daß das für die

Eichkurve notwendige p-Nitrophenol in gleicher Weise von der Firma Boehringer geliefert wird, so daß die Bestimmungen von Zeit zu Zeit durch Vergleichsmessungen mit Standardlösungen nachgeprüft werden können.

Es ist zu empfehlen, das Serum innerhalb von 3 Stunden nach der Entnahme zu verarbeiten. Nach Südhof (29) ist ein Aktivitätsabfall der alkalischen Phosphatase nach 6 bzw. 24 Stunden von 4 % bzw. 12 % bei Aufbewahrung in Zimmertemperatur festzustellen.

Zum Arbeitsgang:

Nach Einsetzen der Teströhrchen in das Inkubationsbad von 37°C wird diese Temperatur vom Reaktionsgemisch in den Teströhrchen nach einer Minute erreicht. Deshalb wird als Inkubationszeit statt 30 Minuten 31 Minuten angegeben. Dadurch erübrigt es sich, die Röhrchen 5 Minuten lang vorzuwärmen.

Da beim Einpipettieren der Substratpufferlösung und des Serums in die Teströhrchen Blasen entstehen können, und keine genügende Mischung deshalb erfolgt, soll dieser Arbeitsgang folgendermaßen durchgeführt werden:

1. Das Reagenz Substratpuffer (50 μ l) wird in die Spitze der Teströhrchen eingefüllt.
2. Das Serum (5 μ l) wird als kleines Tröpfchen knapp darüber an die Wand des Röhrchens pipettiert. Bei Serienbestimmungen werden so alle Teströhrchen für die Probe - die Teströhrchen für die Blindwerte bleiben natürlich ohne Serum - vorbereitet und im Abstand von 30 Sekunden aus dem Ständer entnommen. Dann
3. vorsichtig mischen,
4. 15 Sekunden zentrifugieren und
5. in genauen Abständen von 30 Sekunden in das Wasserbad einstellen. Bei lang-samerer Arbeitstechnik können auch Abstände von z.B. 1 Minute gewählt werden.

Die Teströhrchen für Blindwerte brauchen nicht gemischt und zentrifugiert zu werden. Die Wasserhöhe im Inkubationsbad soll so hoch sein, daß die Röhrchen locker in den Ständerlöchern sitzen und umspült werden können. Bei schnellem Arbeiten können bis zu 4 Bestimmungen (8 Teströhrchen) in einer Versuchsreihe pipettiert werden, da nach Zugabe der Natronlauge nicht viel länger als 5 Minuten mit der Kolorimeterablesung gewartet werden soll.

Zur Einheitsdefinition:

Nach der Einheitsdefinition von Bessey entspricht es einer U. B., wenn in dem Ansatz von insgesamt 305 μ l, der 5 μ l Serum enthält, nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37° C 0,0025 μ Mol p-Nitrophenol nachweisbar sind.

Grundsätzlich sollen die Aktivitätseinheiten von Serumenzymen nach internationaler Übereinkunft in internationalen Einheiten angegeben werden, also in μ Mol

Substrat/min./1000 ml, d.h. 1000 ml Serum setzen in einer Inkubationszeit von 1 min. eine bestimmte Menge (μMol) an Substrat frei (23). Somit entspricht die von Bessey angegebene Einheit von 1 mMol p-Nitrophenol/std./1000 ml 16,70 internationalen Einheiten (I.U.). Es sind von einigen Autoren (23, 22) Umrechnungsfaktoren angegeben worden, welche es unter gewissen Voraussetzungen erlauben, die Einheiten der verschiedenen Autoren umzurechnen und auf internationale Einheiten zu beziehen. Folgende Umrechnungsfaktoren seien hier erwähnt (28):

$$\begin{aligned} n \text{ mMol Einh. (U.B.)} &= 2n - 0,8 \text{ Bodansky Einh.} \\ &= 3,4n \quad \text{Huggins Einh.} \\ &= 4,2n - 2,4 \text{ King-Armstrong Einh.} \\ &= 16,7n \quad \text{Internationale Einh.} \end{aligned}$$

Zur Eichkurve:

In der Versuchsbeschreibung von "Biochemica Boehringer" wird auf eine Eichkurve zur Ermittlung des Faktors f_m verzichtet und dieser aus der Größe des Extinktionskoeffizienten errechnet. Für die oben angegebenen Versuchsbedingungen wird dieser folgendermaßen berechnet (4):

Der Extinktionskoeffizient ist als $k = (-\lg \frac{I_0}{I})$ definiert, und stellt eine vom Material und dessen Konzentration im Lösungsmittel, von der Schichtdicke und von der Wellenlänge des absorbierten Lichtes abhängige Größe dar. Er beträgt $18,8 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$, d.h. $1 \mu\text{Mol} = 140 \text{ mg}$ p-Nitrophenol in 1 ml bei pH 11,5 gelöst, schwächt das Licht der Wellenlänge $400 \text{ m}\mu$ auf einem Weg von 1 cm um $\lg \frac{I_0}{I} = 18,8$. Bezogen auf die Einheitsdefinition nach Bessey und auf die angegebenen Versuchsbedingungen schwächt also $0,0025 \mu\text{Mol} = 0,35$ p-Nitrophenol in 0,305 ml gelöst das Licht der Wellenlänge $400 \text{ m}\mu$ um $18,8/400 \cdot 0,305 = 0,1541$ (bei 1 cm Schichtlänge). Bei einer Schichtdicke von 0,64 cm beträgt die Extinktion jedoch nur $0,1541 \cdot 0,64 = 0,0986$. Die Absorptionsskala am Spektrophotometer bezeichnet den negativen dekadischen Logarithmus der Transmission, so daß die Extinktionsdifferenz ΔE , welche die Differenz der Extinktionen von Blindwert und Probe darstellt, dividiert mit dem oben errechneten Faktor ergibt, um das Wievielfache der definierten Einheit die Absorption jeweils verändert wird, also

$$\frac{\Delta E}{0,0986} = \Delta E \cdot 10,12 \text{ U.B.}$$

Der hier errechnete Faktor weicht von einem experimentell aufgrund der Eichkurve ermittelten Wert ab. Daher kann auf keinen Fall auf die Herstellung einer Eichkurve verzichtet werden. Als Ursache für die Abweichung des Faktors sind

Lichtreflexionen und Winkelveränderungen an der Küvette sowie ein nicht sehr genau geschliffener Wandabstand der Küvette, welcher als Schichtlänge der absorbierenden Flüssigkeit gilt, denkbar.

Die beschriebenen Angaben zur Herstellung der Eichkurve sind der Methodenbeschreibung von M.C. Sanz (24) entnommen. Der Arbeitsgang ist einfach und schnell durchzuführen. Die Herstellung von 5 Verdünnungslösungen hat sich als ausreichend erwiesen.

Normalwerte bei Kindern:

Um den Normbereich der Aktivität der alkalischen Serumphosphatase bei Kindern zu ermitteln, wurden bei Kindern ohne klinische und röntgenologische Zeichen einer rachitischen Erkrankung im Alter von einem halben Monat bis zu 14 Jahren 30 Dreifachbestimmungen durchgeführt. Es ergab sich ein Mittelwert von 5,73 U.B., welche 95,69 Internationalen Einheiten entsprechen würde. Als Minimalwert wurden 3,0 U.B., als Maximalwert 8,6 U.B. gefunden. Die Einzelwerte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Phosphatasewerte bei gesunden Kindern nach der beschriebenen Methode in U.B.):

Tabelle 2

Nr.	Alter in J.	U. B.	Nr.	Alter in J.	U. B.
1	0, 5/12	6, 6	16	6 4/12	6, 4
2	1/12	5, 4	17	6 6/12	4, 2
3	6/12	8, 5	18	6 8/12	4, 6
4	1 1/12	6, 3	19	6 9/12	4, 6
5	1 1/12	7, 6	20	7	7, 5
6	1 2/12	8, 6	21	7 2/12	5, 2
7	1 3/12	5, 8	22	8	4, 3
8	1 6/12	3, 8	23	8 3/12	3, 0
9	1 9/12	3, 9	24	10	8, 2
10	1 10/12	6, 2	25	10 3/12	6, 8
11	2	7, 9	26	11	6, 4
12	2 11/12	3, 8	27	12	6, 6
13	4 6/12	4, 4	28	12	7, 1
14	4 8/12	4, 8	29	13 4/12	3, 5
15	5 11/12	3, 8	30	14 4/12	6, 2

Die gefundenen Normalwerte entsprechen gut den vergleichbaren Werten in der Literatur: Keller-Wiskott (16) gibt einen Normalbereich von 3-8 U.B., Sanz (24)

von 5-12 U.B., und Fanconi-Wallgren (6) von 1,2 - 5,1 U.B. an (Umgerechnete Werte nach den Umrechnungsfaktoren auf Seite 18).

Fehlerrechnung:

Um ein Maß für die Genauigkeit der Methode zu gewinnen, wurden nach oben angegebenen statistischen Berechnungen die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert σ und der Variationskoeffizient CV bestimmt. Dabei wurden 10 Serienbestimmungen zu je 10 Einzelbestimmungen durchgeführt, wobei die Phosphataseaktivität der bestimmten Seren im physiologischen Bereich liegt. Als Mittelwert der mittleren quadratischen Abweichungen vom Mittelwert wurde $\sigma_m = 1,19$ gefunden, als Mittelwert des Variationskoeffizienten $CV_m = 2,27\%$. Die Einzelergebnisse sind in den folgenden Tabellen angegeben (Tabelle 3 enthält 10 Einzeltabellen, worin jeweils 10 Einzelbestimmungen zu einer Serie zusammengefaßt sind.):

Tabelle 3

Serie I:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,130	0,320	0,190	2,88	7	19,6	0,02	0,0028
	0,330	0,200	3,04	3	9,0	0,18	0,0972
							28,6
							0,1000
$\sigma = \pm 0,10$				CV = 3,5 %			

Serie II:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,125	0,330	0,205	3,12	7	21,84	0,05	0,0175
	0,320	0,195	2,96	3	8,88	0,11	0,0363
							0,0538
$\sigma = \pm 0,07$				CV = 2,3 %			

Serie III:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,125	0,330	0,205	3,12	1	3,12	0,21	0,0441
	0,340	0,215	3,27	4	13,08	0,06	0,0144
	0,350	0,225	3,42	5	17,10	0,09	0,0405
33,30							0,0990

$$\sigma = \pm 0,09$$

$$CV = 3,0 \%$$

Serie IV:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,120	0,420	0,300	4,56	4	18,24	0,10	0,0400
	0,430	0,310	4,71	5	23,55	0,05	0,0125
	0,440	0,320	4,86	1	4,86	0,20	0,0400
46,65							0,0925

$$\sigma = \pm 0,09$$

$$CV = 2,0 \%$$

Serie V:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,125	0,420	0,295	4,48	1	4,48	0,24	0,0576
	0,430	0,305	4,64	4	18,56	0,08	0,0254
	0,440	0,315	4,78	4	19,12	0,06	0,0144
	0,460	0,335	5,09	1	5,09	0,31	0,0961
47,25							0,1935

$$\sigma = \pm 0,14$$

$$CV = 2,7 \%$$

Serie VI:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,120	0,400	0,280	4,25	1	4,25	0,43	0,1849
	0,420	0,300	4,56	1	4,56	0,12	0,0144
	0,430	0,310	4,71	6	28,26	0,03	0,0054
	0,440	0,320	4,86	2	9,72	0,18	0,0648
					46,79		0,2695

$$\sigma = \pm 0,16$$

$$CV = 3,5 \%$$

Serie VII:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,125	0,460	0,335	5,09	1	5,09	0,27	0,0729
	0,470	0,345	5,24	2	10,48	0,12	0,0288
	0,480	0,355	5,39	5	26,95	0,03	0,0045
	0,490	0,365	5,54	2	11,08	0,18	0,0648
					53,60		0,1710

$$\sigma = \pm 0,13$$

$$CV = 2,4 \%$$

Serie VIII:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,110	0,440	0,330	5,01	7	35,07	0,07	0,0343
	0,450	0,340	5,16	2	10,37	0,08	0,0128
	0,470	0,360	5,47	1	5,47	0,39	0,1521
					50,86		0,1992

$$\sigma = \pm 0,14$$

$$CV = 2,7 \%$$

Serie IX:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,115	0,560	0,445	6,76	3	20,28	0,21	0,1323
	0,570	0,455	6,91	1	6,91	0,06	0,0036
	0,580	0,465	7,06	5	35,30	0,09	0,0405
	0,590	0,475	7,22	1	7,22	0,25	0,0625
						69,71	0,2389

$$\sigma = \pm 0,15$$

$$CV = 2,2\%$$

Serie X:

Blindw.	Probe	ΔE	x_i	f_i	$x_i f_i$	$x_i - x_m$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,120	0,390	0,270	4,10	2	8,20	0,16	0,0512
	0,400	0,280	4,25	6	25,50	0,01	0,0006
	0,410	0,290	4,40	1	4,40	0,14	0,0196
	0,420	0,300	4,56	1	4,56	0,30	0,0900
						42,66	0,1614

$$\sigma = \pm 0,12$$

$$CV = 2,9\%$$

II. BESTIMMUNG DES ANORGANISCHEN PHOSPHORS IM SERUM

1. Entwicklung der Methode

Bei der Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphors im Serum wird ein Bestimmungsprinzip angewandt, welches auf der Ausfällung der Phosphate als Ammoniumphosphormolybdat beruht und als vielfach modifiziertes Molybdatverfahren für kolorimetrische Bestimmungsmethoden sehr beliebt ist. Die Methode erlaubt Bestimmungen sehr kleiner Phosphormengen bis zu 0,1 μ g Phosphor/ml, was als unterste Bestimmungsgrenze des Phosphors gilt (20). Verständlich wird diese Tatsache dadurch, daß 1 mg Phosphor als Farbkomplex einen Niederschlag von 70 mg im Reaktionsgemisch ergibt, der dann kolorimetrisch als Phosphormolybdänblau bestimmt werden kann (20).

Die Ausfällung der Phosphate geschieht als Triammoniumdodekamolybdophosphat $(NH_4)_3P(Mo_3O_{10})_4$. Die genauen Reaktionsmechanismen dieser Ausfällung sowie

der nachfolgenden Reduktion zu dem blauen Farbkomplex sind noch weitgehend unbekannt (11). Die Reduktion der Molybdänsäure läßt sich auch ohne Phosphorsäure durchführen, jedoch hat der Phosphor katalysatorische Wirkung, so daß die Phosphormolybdänsäure schneller reduziert wird. Diese Tatsache wird bei der kolorimetrischen Bestimmung des Phosphors ausgenutzt, da es ein für Phosphormolybdänsäure spezifisches Reduktionsmittel nicht gibt. Dem dabei entstehenden Molybdänblau in Anwesenheit von Phosphor wird die chemische Formel $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7(\text{MoO}_4)_2 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ zugeschrieben.

Taylor und Miller (30) beschrieben 1914 mehrere brauchbaren Reduktionsmittel wie Hydrochinon, Hydrazin und Phenylhydrazin. Durch Weiterentwicklung dieser Verfahren durch Bell und Doisy (1) hat Hydrochinon vielfache Anwendung gefunden. Jedoch erwiesen sich diese Reduktionsmittel besonders bei mikromethodischen Modifikationen als nachteilig, da die Farbstabilität in alkalischer Lösung nicht konstant und die Reaktion sehr temperatur- und pH-abhängig ist. Außerdem ist die Reaktion geringen Phosphormengen gegenüber zu wenig empfindlich.

So fanden Fiske und Subbarow 1925 (7) in der 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure ein geeignetes Reduktionsmittel. Die von den Autoren angegebene Methode ist vielfach modifiziert worden (2, 13) und stellt auch die Grundlage für die im Ultramikroanalytensystem beschriebene Methode dar. Sie hat sich bei der praktischen Anwendung besonders in mikromethodischen Verfahren als sehr vorteilhaft erwiesen, da die Farbindensität des Molybdänkomplexes genügend stark und konstant ist, weshalb Bestimmungen bis zu 0,1 μg Phosphor/ml möglich sind (20), was, wie oben erwähnt, als unterste Bestimmungsgrenze des Phosphors gilt. Erhitzen des Reaktionsgemisches ist dabei nicht erforderlich.

2. Beschreibung der Methode (31):

Prinzip:

(Modifizierte Methode nach Fiske und Subbarow)

Die Serumproteine werden mit Trichloressigsäure gefällt, und das proteinfreie Filtrat wird mit Molybdänsäure behandelt. Die gebildete Phosphormolybdänsäure wird mit Aminonaphtolsulfonsäure reduziert und bildet einen blauen Molybdänkomplex. Die Intensität des blauen Farbstoffes ist proportional dem Gehalt an anorganischem Phosphor im vorliegenden Serum.

Ausführung:

Man verwendet 400 μl -Teströhrchen zur Bestimmung von Blindwert, Standard und Probe. Es wird dieselbe Pipette für den Blindwert, Standard und das Serum genommen. Die Pipette wird gespült, indem man einen Tropfen der betreffenden Flüssigkeit überlaufen läßt. Angaben in Mikrolitern:

Tabelle 4 (Arbeitsgang zur Phosphorbest.)

Reagenz	Teströhrchen f. Blindwert	Teströhrchen f. Stand.	Teströhrchen für Probe
aqua destillata	20 μ l		
Standardlösung		20 μ l	
Serum			20 μ l
aqua destillata	50 μ l	50 μ l	50 μ l
mischen			
Trichloressigsre.	80 μ l	80 μ l	80 μ l
mischen			
2 min. stehen lassen			
1 min. zentrifugieren			
übertragen in neue Teströhrchen			
überstehende Lsg.	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Molybdänsäure	20 μ l	20 μ l	20 μ l
mischen			
ANSA-Lösung	20 μ l	20 μ l	20 μ l
mischen			
genau 30 min. stehen lassen			
bei Wellenlänge 650 m μ Standard- und Probelösung			
gegen den auf 0 eingestellten Blindwert kolorimetrieren			

Berechnung:

$$\frac{\text{Probe}}{\text{Standard}} \cdot 4 = \text{mg Phosphor/100 ml}$$

Reagenzien:

Man verwendet entweder den Phosphor Chempak oder man bereitet die erforderlichen Reagenzien wie folgt:

Phosphorvorratsstandard 40 mg% : man löst 0,175 g Kaliumhydrogenphosphat, KH_2PO_4 (über Nacht bei 80° C im Exsiccator getrocknet und abgekühlt), in

100 ml destilliertem Wasser. Die Lösung wird in 30 ml braunen Polyäthylenflaschen unter Toluol aufbewahrt.

Phosphorarbeitsstandard 4 mg% : man verdünnt 20 μ l des Vorratsstandards mit 180 μ l destilliertem Wasser in einem Mikroteströhrchen. Gut mischen und täglich frisch bereiten.

Trichloressigsäure 10% : man löst 10 g Trichloressigsäure in destilliertem Wasser und verdünnt auf 100 ml. In 30 ml Polyäthylenflaschen aufzubewahren.

Molybdänsäure 2,5% : man löst 4,2 ml konzentrierte Schwefelsäure in ungefähr 50 ml destilliertem Wasser. In dieser Mischung lost man 2,5 g Ammoniummolybdat und verdünnt mit destilliertem Wasser auf 100 ml. In 30 ml Polyäthylenflaschen aufzubewahren.

Aminonaphtolsulfonsäure (ANSA) 0,05% : man löst 14,6 g Natriumbisulfit, NaHSO_3 , und 0,5 g Natriumsulfit, Na_2SO_3 , in destilliertem Wasser und verdünnt auf 100 ml. Dazu gibt man 0,1 g pulverisierte 1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfonsäure und löst diese durch Schütteln auf. Die Lösung wird in braunen 30 ml Polyäthylenflaschen aufbewahrt. Der flockige Niederschlag, der sich nach der Abkühlung der ANSA-Lösung im Kühlschrank bilden kann, geht bei Zimmertemperatur wieder in Lösung. Falls die ANSA-Lösung wolkig getrübt und verfärbt ist, oder umher-schwimmende Partikelchen enthält, filtriert man sie vor dem Gebrauch über Aktiv-Kohle.

Phosphorchempak: (Anstatt des von der Firma Beckman-Instruments gelieferten Chempaks werden die Lsg. wie folgt bereitet)

Zubereitung der Lösungen:

Arbeitsstandard:

1. Mittels der Stock-Transfer-Pipette überträgt man 20 μ l des Stock-Standards (unterhalb der Toluolschicht) in ein 400 μ l Mikroteströhrchen.
2. Man gibt 180 μ l destilliertes Wasser mit der Destilled-Water-Pipette zu. Gründlich durchmischen.
3. Die Lösung täglich frisch bereiten.

Aminonaphtolsulfonsäure (ANSA):

1. Man gießt 25 ml warmes destilliertes Wasser in die 30 ml-Flasche mit der Aufschrift Ansa-Sulfite-Blend.
2. Man mischt durch Schütteln, bis alles gelöst ist.
3. Man überträgt die Lösung in eine braune Flasche mit der Aufschrift ANSA.
4. Auf der Flasche befestigt man eine 20 μ l Pipette.
5. Die Lösung im Kühlschrank aufbewahren. Der flockige Niederschlag, der sich bei der Abkühlung der ANSA-Lösung im Kühlschrank bilden kann, geht bei Zimmertemperatur wieder in Lösung. Falls die ANSA-Lösung wolkig getrübt oder ver-

färbt ist, oder umherschwimmende Partikelchen enthält, filtriert man sie vor dem Gebrauch über Aktiv-Kohle.

3. Diskussion:

Zur Methode:

Während der Methodenprüfung wurde von der Firma Beckman-Instruments eine geringe Vereinfachung der Arbeitsausführung angegeben, wobei anstatt der vorher verwandten 50 μl aqua destillata und 80 μl Trichloressigsäure jetzt nur noch 150 μl Trichloressigsäure in einem Arbeitsgang hinzupipettiert werden sollen. Durch diese Maßnahme sollte die Menge der überstehenden Flüssigkeit im 4. Arbeitsgang vergrößert werden und ein Aufwirbeln des Filtratsatzes beim Abpipettieren sowie das Übertragen desselben in das neue Teströhrchen vermieden werden. Falls das dennoch nicht möglich ist, kann während der Farbentwicklung am Ende der Reaktion zusätzlich noch einmal zentrifugiert werden und die überstehende Farblösung sorgfältig in die Küvette abpipettiert werden.

Als Standardlösung wurde eine wässrige Lösung von KH_2PO_4 zu 4 mg% verwandt, die in dieser Konzentration hergestellt und aufbewahrt wurde. Bei der Verwendung einer Standardarbeitslösung durch zehnfache Verdünnung der Standardvorratslösung von 40 mg% auf 4 mg% nach der Originalvorschrift ergaben sich ungenaue und unterschiedliche Konzentrationen. Als Ursache dafür wird das einmalige Pipettieren mit einer 20 μl Pipette angesehen, welche je nach der Benetzbarkeit ihrer Oberfläche unterschiedliche Rückstände nach der Entleerung behält. Die Bereitung solcher Konzentrationen zur Gewinnung von Standardlösungen in dem Mengbereich von Mikrolitern hat sich als unzweckmäßig erwiesen.

Zur Kolorimeterablesung:

Durch unzeitgemäßes Kolorimetrieren der Farblösung sind Fehlermöglichkeiten gegeben. Da die Änderung der Farbintensität nach einem Zeitraum von 30 min. nur noch sehr gering ist, wird zu diesem Zeitpunkt die Extinktionsmessung vorgenommen. Das konstante Zeitintervall zwischen der Zugabe des Reduktionsmittels als ANSA-Lösung zu dem Reaktionsgemisch und der Ablesung der Extinktion am Spektrokolorimeter läßt sich auch bei größeren Serienbestimmungen genau einhalten, indem die Zugabe der ANSA-Lösung sowie die entsprechende Ablesung der Extinktion in Zeitabständen von 30 sec. oder 1 min. - je nach Arbeitgeschwindigkeit - erfolgen.

Zur erforderlichen Blutmenge:

Zu einer Dreifachbestimmung werden $3 \cdot 20 \mu\text{l} = 60 \mu\text{l}$ Blutserum gebraucht, wobei man zum Vorspülen der Pipette noch 20 μl benötigt. Das entspricht einer Blutmenge von etwa 0,2 - 0,3 ml oder 4-5 Tropfen. Diese Blutmenge läßt sich ohne Schwierigkeit mittels Schnepferstich aus der Fingerbeere oder Ferse gewinnen.

Normalwerte bei Kindern:

Zur Bestimmung des Normalbereiches des anorganischen Phosphors im Serum von Kindern wurden entsprechende Einzelbestimmungen durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte einzelner Altersgruppen liegen zwischen 4,2 und 7,3 mg% und verteilen sich wie folgt auf die verschiedenen Altersgruppen:

Alter in Jahren:	0 - 1	Mittelwerte:	7,3 mg%
	2 - 4		6,3 mg%
	5 - 10		4,5 mg%
	11 - 15		4,2 mg%

Es werden die Einzelergebnisse in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Tab. 5 enthält Normalwerte gesunder Kinder in mg% anorg. Phosphor im Serum):

Tabelle 5

Alter in Jahren	Werte in mg%	Mittelwert
1	8,6 7,5 7,6 7,3 6,0 5,9	7,3
2	7,2 5,3	
3	5,9	6,3
4		
5	5,6 4,2 4,8	
6	4,9 5,5 4,7 3,5 3,6	
7	4,8 4,8 4,6 5,1	
8	5,0 4,8	4,5
9	4,6 5,6	
10	5,7	
11	3,8 3,7 4,5 4,7 4,3	
12	4,7	
13	3,4 5,0	4,2
14	3,2 4,7	
15	4,5	
16	3,9 4,2	

Auf Grund der hohen Schwankungsbreite der Mittelwerte einzelner Altersgruppen erscheint es erforderlich, an Hand von Tabellen die Phosphorkonzentrationen in Beziehung zu den entsprechenden Altersgruppen zu setzen. So ist es möglich, den erhaltenen Wert nach jeder Einzelbestimmung mit dem altersentsprechenden Normalwert zu vergleichen, um auch pathologische Veränderungen geringen Ausmaßes zu erkennen. Bei Einführung neuer Methoden in einem Laboratorium erscheint es zweckmäßig, etwa 50 Orientierungsbestimmungen durchzuführen, da die Ergebnisse auch bei Anwendung gleicher Arbeitsmethoden oft von Labor zu Labor verschieden sind.

In der Literatur werden Phosphorkonzentrationen angegeben, welche den hier gefundenen Werten weitgehend entsprechen. Abweichungen sind durch ungenaue Zuordnung der Phosphorwerte zu den entsprechenden Altersgruppen zu erklären. Die angegebenen Zahlenwerte bedeuten Konzentrationsangaben in mg%:

	Neugeb.	Säugl.	Kinder
Keller-Wiskott (16)	4-8	4, 5-5, 5	3-4
Fanconi-Wallgren (6)	6, 88 $\pm$ 1, 57		4, 76 $\pm$ 0, 41
Geigy-Wissensch. -Tab. (9)			4-7
Stearns-Warberg (27)	5, 6		5, 0-5, 5

Zur Fehlerrechnung:

Um einen Anhaltspunkt über die Genauigkeit der Methode zu gewinnen, wurden Reihenbestimmungen mit wäßrigen Lösungen von KH_2PO_4 durchgeführt. Mit den Konzentrationen von 2, 4, 6, 8, 10 mg% wurden von jeder Konzentration 2·10 Einzelbestimmungen gemacht. Die statistischen Berechnungen erfolgten nach dem oben angegebenen Prinzip. Es ergab sich als Maß für die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert ein σ von $\pm 0,138$ und ein Variationskoeffizient von 3,32 %. Die σ -Werte und einzelnen Variationskoeffizienten der verschiedenen Konzentrationen sind in einer Tabelle zusammenfassend dargestellt. Bei einem pathologischen Wert von 10 mg% anorganischem Phosphor im Serum würde sich dabei eine Streuung von 3,7 % oder 0,37 mg% Phosphor ergeben. Wie aus der Darstellung ersichtlich ist, wird die Genauigkeit der Bestimmung bei zunehmender Konzentration nicht wesentlich verändert.

Die ermittelte Genauigkeit gilt für den klinischen Gebrauch als völlig ausreichend. Die Versuchsserien wurden nicht unter der besonderen Absicht durchgeführt, höchstmögliche Genauigkeit zu erreichen, sondern um unter normalen Bedingungen einer Routineuntersuchung die Fehlerbreiten zu bestimmen. Die erhaltenen Ergebnisse erweisen sich deshalb als so günstig, weil ohne erheblichen Aufwand von Zeit und Arbeit genaue Mehrfachbestimmungen möglich sind, so daß zufällige Fehlergebnisse, wie sie häufiger in der Routinearbeit eines Labors vorkommen, fast auszuschließen sind.

In der folgenden Tabelle 6 sind die Serienbestimmungen in 10 Einzeltabellen zusammengefaßt:

Tabelle 6

Phosphatlösung 2 mg %

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - x_m)$	$(x_i - x_m)^2$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,260	0,115	1,76	1	1,76	0,208	0,043264	0,043264
	0,120	1,84	1	1,84	0,128	0,016384	0,016384
	0,125	1,92	1	1,92	0,048	0,002304	0,002304
	0,130	2,00	5	10,00	0,032	0,001024	0,005120
	0,135	2,08	2	4,16	0,112	0,012544	0,025088
			10	19,68			
			$\bar{\sigma} = 0,096$	$V = 4,87\%$			

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - x_m)$	$(x_i - x_m)^2$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,260	0,120	1,84	2	3,68	0,182	0,033024	0,066048
	0,130	2,00	4	8,00	0,022	0,000484	0,001936
	0,135	2,08	3	6,24	0,058	0,003364	0,010092
	0,150	2,30	1	2,30	0,278	0,077284	0,077284
			10	20,22			
			$\bar{\sigma} = 0,125$	$V = 6,16\%$			

Phosphatlösung 4 mg %

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - x_m)$	$(x_i - x_m)^2$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,250	0,240	3,84	1	3,84	0,1360	0,018496	0,018496
	0,245	3,92	3	11,76	0,056	0,003136	0,009408
	0,240	4,00	5	20,00	0,024	0,000576	0,002880
	0,260	4,16	1	4,16	0,184	0,033856	0,033856
		10	39,76	0,064640			
$\sigma =$		0,080	$V =$		2,02		

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - x_m)$	$(x_i - x_m)^2$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,275	0,270	3,92	4	15,68	0,096	0,009216	0,036864
	0,275	4,00	4	16,00	0,016	0,000256	0,001024
	0,290	4,24	2	8,48	0,224	0,052176	0,100352
			10	40,16	0,138240		
$\sigma = 0,118$		V =		2,94 %			

Phosphatlösung 6 mg %

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - \bar{x}_m)$	$(x_i - \bar{x}_m)^2$	$(x_i - \bar{x}_m)^2 f_i$
0,250	0,380	6,08	1	6,08	0,224	0,050176	0,050176
	0,390	6,24	5	31,20	0,064	0,004096	0,020480
	0,400	6,40	3	19,20	0,096	0,009216	0,027648
	0,410	6,56	1	6,56	0,256	0,065536	0,065536
			10	63,04			
			$\sigma = 0,128$		$V = 2,03 \%$		

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - \bar{x}_m)$	$(x_i - \bar{x}_m)^2$	$(x_i - \bar{x}_m)^2 f_i$
0,260	0,370	5,68	1	5,68	0,272	0,073984	0,073984
	0,380	5,84	4	23,36	0,112	0,012544	0,050176
	0,390	6,00	4	24,00	0,048	0,009216	0,009216
	0,420	6,48	1	6,48	0,528	0,278784	0,278784
			10	59,52			
			$\sigma = 0,203$		$V = 3,41 \%$		

Phosphatlösung 8 mg %

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - x_m)$	$(x_i - x_m)^2$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,260	0,520	8,00	8	64,00	0,032	0,001024	0,008192
	0,530	8,16	2	16,32	0,028	0,000784	0,001568
			10	80,32			0,009760
$\sigma = 0,0312$		$V = 0,39\%$					

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - x_m)$	$(x_i - x_m)^2$	$(x_i - x_m)^2 f_i$
0,255	0,500	7,96	1	7,96	0,360	0,1296	0,1296
	0,520	8,16	2	16,32	0,160	0,0256	0,0512
	0,530	8,36	6	50,16	0,040	0,0016	0,0096
	0,550	8,76	1	8,76	0,340	0,1156	0,1156
			10	83,20			0,3060
$\sigma = 0,175$		$V = 2,10\%$					

Phosphatlösung 10 mg %

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - \bar{x}_m)$	$(x_i - \bar{x}_m)^2$	$(x_i - \bar{x}_m)^2 f_i$
0,270	0,630	9,32	2	18,64	0,644	0,414736	0,839472
	0,660	9,80	2	19,60	0,164	0,026896	0,053792
	0,680	10,08	1	10,08	0,116	0,013456	0,013456
	0,690	10,24	4	40,96	0,276	0,076176	0,304704
	0,700	10,36	1	10,36	0,396	0,156816	0,156816
			10	99,64			1,358240
			$\bar{x} = 0,369$		$V = 3,70 \%$		

Stand.	Probe	x_i	f_i	$x_i f_i$	$(x_i - \bar{x}_m)$	$(x_i - \bar{x}_m)^2$	$(x_i - \bar{x}_m)^2 f_i$
0,255	0,630	10,08	3	30,24	0,084	0,007056	0,021168
	0,640	10,20	7	71,40	0,036	0,001296	0,009072
			10	101,64			0,030240
			$\bar{x} = 0,055$		$V = 5,41 \%$		

Tabelle 7

Zusammenfassende Wertetabelle
(Die Einzelwerte der Tabelle 6
sind hier zusammengestellt.)

Konzentrat.	Sigma	Var. -Koeff.	Wert in mg%
2 mg%	0,0960	4,87 ‰	0,10 mg%
	0,1246	6,16 ‰	0,12 mg%
4 mg%	0,0804	2,02 ‰	0,08 mg%
	0,1179	2,94 ‰	0,12 mg%
6 mg%	0,1280	2,03 ‰	0,12 mg%
	0,2030	3,41 ‰	0,20 mg%
8 mg%	0,0312	0,39 ‰	0,03 mg%
	0,1750	2,10 ‰	0,17 mg%
10 mg%	0,3690	3,70 ‰	0,37 mg%
	0,0550	5,41 ‰	0,54 mg%

D. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode im Mikroliterbereich zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum mit dem Ultramikroanalysensystem nach M.C. Sanz beschrieben, sowie die Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphors im Serum nach dem gleichen System auf seine Verwendbarkeit in der klinischen Laboratoriumsdiagnostik geprüft.

Die Methode zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase stellt eine Modifikation der Methode nach Bessey dar. Es werden die Reagenzien der Firma Boehringer benützt, und die Angaben zur Erstellung einer Eichkurve nach M.C. Sanz beschrieben. Durch Kombination und Vereinfachung geeigneter und bewährter Methoden wurde so eine Bestimmungsmethode entwickelt, welche sich besonders für die Routinearbeit des Laboratoriums eignet.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß die alkalische Phosphatase infolge hydrolytischer Spaltung aus dem p-Nitrophenylphosphat unter konstanten Bedingungen p-Nitrophenol freisetzt, welches kolorimetrisch bestimmt wird und ein Maß für die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist.

Die erforderliche Serummenge beträgt 5 µl, und es können in der Stunde bis zu sechs Einzelbestimmungen durchgeführt werden. Als mittlerer Wert für die Aktivität der Serumphosphatase bei gesunden Kindern wurde ein Wert von 5,73 U.B. (mMol-E.) gefunden, als Minimalwert 3,0 U.B., als Maximalwert 8,6 U.B. Die Fehlerbreite der Methode ergibt sich aus dem Variationskoeffizienten von 2,72 %.

Die Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphors im Serum ist nach Fiske und Subbarow modifiziert. Es wird Phosphormolybdänsäure gebildet, so daß mit Aminonaphtolsulfonsäure ein blauer Farbkomplex entsteht, welcher kolorimetriert wird und der Konzentration des im Serum vorliegenden Phosphors entspricht.

Zur Bestimmung werden 20 µl Serum benötigt, welche auch zu Dreifachbestimmungen leicht mittels Schnepferstich gewonnen werden können. Die erhaltenen Mittelwerte des anorganischen Serumphosphors bei Kindern verschiedener Altersgruppen liegen zwischen 4,2 und 7,3 mg% und verteilen sich folgendermaßen auf die einzelnen Altersstufen:

1. L.J.	7,3 mg%
2. -3. L.J.	6,3 mg%
4. -9. L.J.	4,5 mg%
10. -15. L.J.	4,2 mg%

Die Fehlerbreite der Methode beträgt bei Serumwerten zwischen 2 - 10 mg% anorgan. Phosphat $\pm 3,32$ % des Phosphatwertes.

Beide hier beschriebenen Methoden haben sich bei ihrer Durchführung im klinischen Laboratorium als leicht und technisch sehr günstigerwiesen. Einige praktische Probleme wurden aufgezeigt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Bell, K.D., Doisy, E.A.
J. biol. Chem. 44, 55, (1920)
2. Bennedikt, S.R., Theis, K.C.
J. biol. Chem. 61, 63, (1924)
3. Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J.
A methode for the determination of alcalin phosphatase
with 5 cmm of serum
J. biol. Chem. 164, 321, (1946)
4. Boehringer, C.F. & Söhne
Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase im
Serum Testcombination-Alkal. Phosphatase
5. Bodansky, A. J. biol. Chem. 101, 93, (1933)
6. Fanconi, G., Wallgren, A.
Lehrbuch der Pädiatrie, Basel-Stuttgart 1961
7. Fiske, C.H., Subbarow, Y.
J. biol. Chem. 66, 375, (1925)
8. Gebelein, H., Heite, H.J.
Statistische Urteilsbildung, Berlin-Göttingen-Heidelberg
1951
9. Geigy - Documenta
Wissenschaftliche Tabellen Basel 1960
10. Gutman, A.B., Gutman, E.B.
Estimation of acid Phosphatase activity of blood serum
J. biol. Chem. 136, 201, (1940)
11. Hinsberg, Lang Medizinische Chemie, München-Berlin-Wien 1957
12. Hövels, O.
Laun, M. Untersuchung über die Bestimmung der alk. Phosphatase-
aktivität in kleinen Serummengen
Z. Kinderheilkunde, 71, 357, (1952)
13. Horecker, B.L., Ma, T.S., Haas, E.
Note on the determination of mikroquantities of organic
phosphorus
J. biol. Chem. 136, 775, (1940)

14. Hudson, u. Mitarb.
 A simple Method for the Determination of serum acid
 phosphatase
 J. Urological 58, 89, (1947)
15. Huggins, Ch., Talalay, P.
 Sodium phenolphthaleinphosphate as Substrate for Phosphatase
 tests
 J. biol. Chem. 159, 399, (1945)
16. Keller, W., Wiskott, A.
 Lehrbuch der Kinderheilkunde Stuttgart 1961
17. King, E.J., Armstrong, A.K.
 Canad. Med. Assoc. Journal 31, 376 (1934)
18. King, E.J., Delory, G.E.
 Rates of enzymic Hydrolysis of phosphoric esters
 Biochem. J. 33, 1185, (1939)
19. Kirberger, E., Martini, G.A.
 Bestimmungsmethode und klinische Anwendung der Phosphatase-
 aktivität im Blut
 Deutsch. Arch. Klin. Med. 197, 268, (1950)
20. Klement, R. Handbuch der analytischen Chemie Bd. V, a, B. 1953
21. Linhardt, K., Walter, K.
 Vergleichende Versuche und Betrachtungen über die Bestim-
 mung der Serumphosphate
 Med. Mschr. 1, 22, (1951)
22. Linhardt, K., Walter, K.
 Über die Brauchbarkeit der Phosphatasebestimmung nach
 Huggins und Talalay
 Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem. 289, 245, (1952)
23. Richterlich, R., Schaefroth, P., Colombo, J.P., Temperli, F.
 Die Wahl von Enzymeinheiten bei diagnost. Untersuchungen
 Klin. Wschr. 39, 987, (1961)
24. Sanz, M.C. Microlitre détermination de la phosphatase alcaline
 (unveröffentlicht)
25. Schreml, W. Über die Bestimmung von Chlor und Calcium mit der Ultra-
 mikromethode nach M.C. Sanz
 München 1962

26. Sobel, A.E., Hanok, A.
Ultramikro Quantitative Analysis in Clinical Laboratories
Mikrochemie 39 51, (1952)
27. Stearns, Warberg
Studies of Phosphorus of blood
J. biol. Chem. 102, 749, (1933)
28. Südhof, H. u. Mitarbeiter
Zur Bestimmung der alkalischen und sauren Phosphatase im Blut
Dtsch. Med. Wschr. 87, 249, (1962)
29. Südhof, H., Wötzel, E.
Über die Haltbarkeit von zur Enzymaktivitätsbestimmung vorgesehenen Serumproben
Klin. Wschr. 38, 1165, (1960)
30. Taylor, A.E., Miller, C.W.
J. biol. Chem. 18, 215, (1914)
31. Beckman-Instruments GmbH
Firmenprospekt
32. Büttner, H.
Mikroliteranalysen
Dtsch. med. Wschr. 17, 910 (1963)
33. Sanz, M.C.
Ultramicro Methods and Standardisation of Equipment
Clin. Chem. 3, 406 (1957)

Zu besonderem Dank bin ich Seiner Magnifizenz
Herrn Professor Dr. G. WEBER und Herrn Oberarzt
Priv.-Doz. Dr. D. VOGT für die Überlassung des
Themas und die Unterstützung dieser Arbeit ver-
pflichtet.

L E B E N S L A U F

Am 1.10.1938 wurde ich, Hans Martin Jacobi, als drittes Kind des Dipl. -Ing. Hans Jacobi und seiner Ehefrau Dr. med. Edeltrude Jacobi, geb. Schwarz, in Dortmund geboren. Mein erstes Volksschuljahr verbrachte ich in Gräfenenthal/Thüringen, wonach ich weitere 3 Jahre lang die Volksschule in Dortmund besuchte. Ab Frühjahr 1949 besuchte ich das Stadtgymnasium zu Dortmund, wo ich im März 1958 die Reifeprüfung ablegte. Seit dem Sommersemester 1958 bin ich an der Universität München als Student der Medizin immatrikuliert und habe dort am 19. Juli 1960 die ärztliche Vorprüfung bestanden. Am 25. Februar 1964 habe ich mein Studium mit dem Staatsexamen abgeschlossen.

